

研究报告

气相色谱-质谱定量检测水产品腐败菌群体感应 DKPs 信号分子

赵爱飞¹ 黄旭镇¹ 叶晓锋¹ 朱军莉^{1*} 励建荣²

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院 浙江 杭州 310018)

(2. 辽宁省食品安全重点实验室 渤海大学 辽宁 锦州 121013)

摘要:【目的】为了分析水产品腐败菌群体感应的新型信号分子二酮哌嗪(DKPs)化合物,建立一种简便、灵敏的气相色谱-质谱(GC-MS)定量检测方法。【方法】通过优化气相色谱和质谱条件、培养基和提取溶剂建立定量检测方法,确定 Cyclo-(L-Pro-L-Gly)、Cyclo-(L-Pro-L-Leu)、Cyclo-(L-Leu-L-Leu)和 Cyclo-(L-Pro-L-Phe) 4 种 DKPs 标准品的特征离子,并检测水产品腐败菌荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和波罗的海希瓦氏菌(*Shewanella baltica*)中的 DKPs。【结果】4 种 DKPs 化合物在 1–200 mg/L 范围内线性良好,检测限为 0.06、0.10、0.06 和 0.04 mg/L,定量限为 0.16、0.18、0.14 和 0.12 mg/L,回收率为 51.8%–88.5%,标准偏差为 1.4%–8.3%。以 LB 培养基为细菌培养基,氯仿作为萃取溶剂,检测的 DKPs 含量较高。两种水产品腐败菌都检测到 DKPs 活性,主要种类为 Cyclo-(L-Pro-L-Leu)和 Cyclo-(L-Pro-L-Phe)。随着两种细菌的生长,培养上清中 DKPs 含量显著增加,在 12 h 达到最高。【结论】建立了检测细菌 DKPs 的 GC-MS 定量方法,具有较高精密度、准确度,能够准确定量分析 4 种 DKPs 的含量。为探究水产品特定腐败菌 DKPs 的调控机制奠定基础。

关键词: 群体感应, 二酮哌嗪信号分子, 气相色谱-质谱联用, 腐败菌

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31271954); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LY15C200001); Innovation Foundation for Postgraduate of Zhejiang Gongshang University (No. 3100XJ1514133)

***Corresponding author:** E-mail: junlizhu0305@163.com

Received: May 13, 2015; **Accepted:** July 16, 2015; **Published online** (www.cnki.net): November 18, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31271954); 浙江省自然科学基金项目(No. LY15C200001); 浙江工商大学研究生创新项目(No. 3100XJ1514133)

***通讯作者:** E-mail: junlizhu0305@163.com

收稿日期: 2015-05-13; **接受日期:** 2015-07-16; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-11-18

Quantitative analysis of diketopiperazines of quorum sensing in spoilage bacteria of aquatic products by gas chromatography/mass spectrometry

ZHAO Ai-Fei¹ HUANG Xu-Zhen¹ YE Xiao-Feng¹ ZHU Jun-Li^{1*} LI Jian-Rong²

(1. College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China)

(2. Food Safety Key Laboratory of Liaoning Province, Bohai University, Jinzhou, Liaoning 121013, China)

Abstract: [Objective] To detect a novel signaling molecule of quorum sensing, diketopiperazines (DKPs), in spoilage bacteria of aquatic products, the simple and sensitive technique of GC-MS method was developed for the quantitative analysis. [Methods] By optimizing the conditions of gas chromatography and mass spectrometry, media and extracting solvent, the quantitative measure of diketopiperazines (DKPs) was established. The characteristic ions of four kinds of DKPs standards, cyclo-(L-Pro-L-Gly), cyclo-(L-Pro-L-Leu), cyclo-(L-Leu-L-Leu) and cyclo-(L-Pro-L-Phe), was ensured. The DKPs activity in two spoilage bacterial of aquatic product, *Pseudomonas fluorescens* and *Shewanella baltica*, were detected. [Results] Four DKPs had good linear at range of 1–200 mg/L. The limits of detection were 0.06, 0.10, 0.06 and 0.04 mg/L, respectively. The limits of quantification were 0.16, 0.18, 0.14 and 0.12 mg/L, respectively. The recovery of four DKPs in the medium was among 51.8%–88.5% with the RSDs of 1.4%–8.3%. The higher level of DKPs was detected with chloroform served as extracting solvent and LB used as medium. Two kinds of DKPs, including cyclo-(L-Pro-L-Leu) and cyclo-(L-Pro-L-Phe), were found in *P. fluorescens* and *S. baltica*. The level of DKPs in two spoilage bacteria increased with the bacterial growth, and arrived to the highest activity for 12 h of culture. [Conclusion] The technique of GC-MS method developed could analyze quantitatively the levels of four kinds DKPs in spoilage bacteria, with high precision and accuracy.

Keywords: Quorum sensing, Diketopiperazines, Gas chromatography/mass spectrometry, Spoilage bacteria

群体感应(Quorum sensing, QS)是细菌通过分泌可溶性自诱导物(Autoinducer, AI),作为信号分子来监测群体密度并协调细菌生物功能的信息交流机制,如生物发光、生物被膜形成、毒素产生、腐败调控、抗生素形成和群游现象等^[1]。细菌 QS 首次发现于 *Vibrio fischeri* 的发光现象研究^[2]。目前 QS 研究主要以细菌产生的自诱导物为着手点,主要包括大多数革兰氏阴性菌中的高丝氨酸内酯类(N-acyl-L-homoserine lactones, AHLs)、革兰氏阳性细菌的寡肽(Autoinducing peptides, AIP)及用于种间交流的呋喃酰硼酸二酯类化合物(Autoinducer-2, AI-2)。近年来,二酮哌嗪类化合物(Diketopiperazines, DKPs)也被证明是一种新的细菌群体感应信号分子^[3],在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、奇异变形杆菌(*Proteus*

mirabilis)、成团肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*)、弗氏枸橼酸杆菌(*Citrobacter freundii*)等革兰氏阴性细菌的培养上清中都能检测到^[4]。细菌分泌的 DKPs 能与特定的 LuxR 型蛋白结合,调节某些细菌的 QS 系统^[3-4]。DKPs 还可参与 QS 系统的信息传递,根据细胞密度调节基因的表达,部分代替 AHLs 作用,与 LuxR 蛋白结合,促进或猝灭 QS^[5]。Gu 等^[3]发现 DKPs 作为波罗的海希瓦氏菌(*Shewanella baltica*)信号分子,促进腐败作用。

至今有多种方法应用于检测信号分子,主要包括微生物传感菌检测法(报告菌法, TLC 等)和仪器检测法(HPLC, LC-MS, GC, GC-MS)。报告菌检测信号分子方便,但需要特定的报告菌株,稳定性较差,仅用于定性分析^[6-7]。TLC 是检测信号分子常见的手段,方法灵敏有效,但也用于定性分析^[8]。

GC/GC-MS 和 HPLC/HPLC-MS 常用来检测 AHL 信号分子, 具有较高的准确度、灵敏性、抗干扰能力, 在检测未知且复杂的信号分子方面有不可替代的作用^[9-11]。目前, 定量检测 DKPs 的研究仍较少。Axel 等^[12]采用 HRGC/MS 结合同位素稀释法检测发现, 乳酸菌在 MRS 培养基中能够分泌 Cyclo-(L-Leu-L-Pro) 和 Cyclo-(L-Pro-L-Pro)。Brack 等^[13]采用 GC-MS 和 LC-MS 发现 *Bacillus pumilus* 能够分泌 Cyclo-(L-Ala-L-Pro)、Cyclo-(L-Gly-L-Pro) 和 Cyclo-(L-Val-L-Pro) 等 9 种 DKPs。上述方法主要侧重于 DKPs 的定性分析, 或者需要繁琐的前处理或需结合其他技术才能实现定量分析。鉴于此, 本研究以 GC-MS 为分析平台, 建立水产品特定腐败菌 *P. fluorescens* 和 *S. baltica* 中 DKPs 信号分子的定性和定量分析技术, 以期为研究细菌群体感应的调控机制奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和试剂

P. fluorescens LP1 和 *S. baltica* XH2 为实验室分离株; DKPs 化合物 Cyclo-(L-Pro-L-Gly)、Cyclo-(L-Leu-L-Leu)、Cyclo-(L-Pro-L-Leu) 和 Cyclo-(L-Pro-L-Phe) 标准品, 上海生工生物工程股份有限公司合成, 纯度为 98% 以上; 甲醇(分析纯和色谱纯), 国药集团化学试剂有限公司; 乙酸乙酯和氯仿, 上海凌峰化学试剂有限公司; LB 和 TSB 培养基, 青岛海博生物技术有限公司。

1.2 主要仪器

GC-MS 仪 7890-5975N, 美国安捷伦科技公司; 台式高速冷冻离心机 3-18K, 美国 Sigma 公司; 真空旋转蒸发仪 EYELA N-1100, 东京理化有限公司; 循环水式多用真空泵, 长城科工贸有限公司; 低温冷却循环系统, 杭州惠创仪器设备有限公司; LRH 系列生化培养箱, 上海一恒科技有限公司。

1.3 信号分子提取

将甘油中保存的细菌培养物在 LB 培养基^[3] 28 °C 活化后, 接种于 50 mL LB 培养基, 于 28 °C、

200 r/min 培养 12 h 后, 10 000×g 离心 10 min, 取上清液用等体积氯仿萃取 3 次, 收集有机相, 再用同等体积超纯水清洗 1 次, 所得有机相在 37 °C 旋转蒸发至干, 用氯仿重新溶解上述提取物, 定容至 1 mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤后进行 GC-MS 分析。

1.4 色谱条件

HP-5ms 毛细柱(30 m×0.25 mm×0.25 nm, Agilent), 载气高纯氦气(>99.999%), 载气恒流流速 1 mL/min, 分流比 50:1, 进样口温度为 260 °C, 进样量为 1 μL。升温程序设置为: 起始温度 50 °C, 保持 2 min 后, 以 15 °C/min 速率上升至 260 °C, 保持 8 min, 传输线温度 220 °C。

1.5 质谱条件

EI 源温度 230 °C, 电子能 70 eV, 质谱保留时间和质谱全扫描定性分析, 质量扫描范围 30–500 amu, 扫描速率为 2 s/scans, 采用离子监控(SIM)模式定量。

1.6 培养基和提取溶剂对信号分子的影响

将活化的 *P. fluorescens* 和 *S. baltica* 分别接种于 LB 和 TSB 培养基^[3], 在 28 °C、200 r/min 培养 9 h, 用氯仿提取信号分子, GC-MS-SIM 检测 DKPs 含量。并且取两种细菌的 LB 培养物分别用氯仿和乙酸乙酯提取信号分子, 分析 DKPs 含量。

1.7 细菌分泌 DKPs 的规律

将 *P. fluorescens* 和 *S. baltica* 接种于 LB 培养基, 在 28 °C、200 r/min 培养, 每隔 3 h 取样, 测定细菌 OD₆₀₀, 并同时取样用氯仿提取信号分子, GC-MS-SIM 检测 DKPs 活性。

1.8 数据处理

实验重复 3 次, 结果以均值±标准偏差表达。采用 Origin 8.0 进行处理和作图, 单因素方差分析(Analysis of variance, ANOVA)用来比较各组间的差异, $P < 0.05$ 表示差异性显著。

2 结果与分析

2.1 GC 色谱条件优化

研究分析了 Cyclo-(L-Pro-L-Gly)、

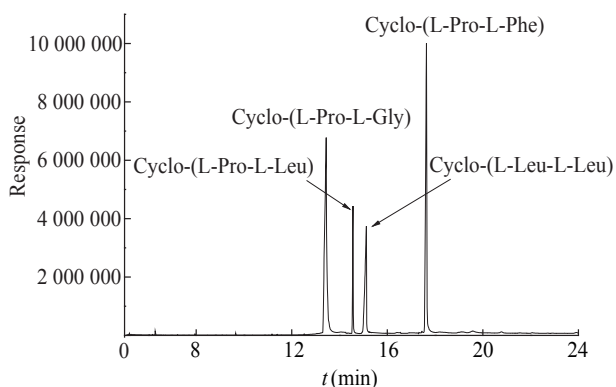


图1 DKPs 标准品 GC-MS 色谱图

Figure 1 The chromatogram of DKPs standards by GC-MS

Cyclo-(L-Pro-L-Leu)、Cyclo-(L-Leu-L-Leu) 和 Cyclo-(L-Pro-L-Phe) 4 种标准品 GC-MS 的色谱条件。如图 1 所示, 采用 Scan 全扫描模式, 优化升温程序, 得到完全分离的标准品色谱图。

2.2 标样保留时间和监测离子通道优化

图 2 为 4 种标准品 Cyclo-(L-Pro-L-Gly)、Cyclo-(L-Pro-L-Leu)、Cyclo-(L-Leu-L-Leu) 和 Cyclo-(L-Pro-L-Phe) 在 GC-MS 中所得的 EI 质谱图, 特征离子的选择见表 1, 分别选择 4 种标准品中的基峰及其它高丰度的特征离子进行 SIM 扫描。高效率的 SIM 模式使 DKPs 检测和定量不需要繁琐的样品纯化, 检测过程更方便快速。

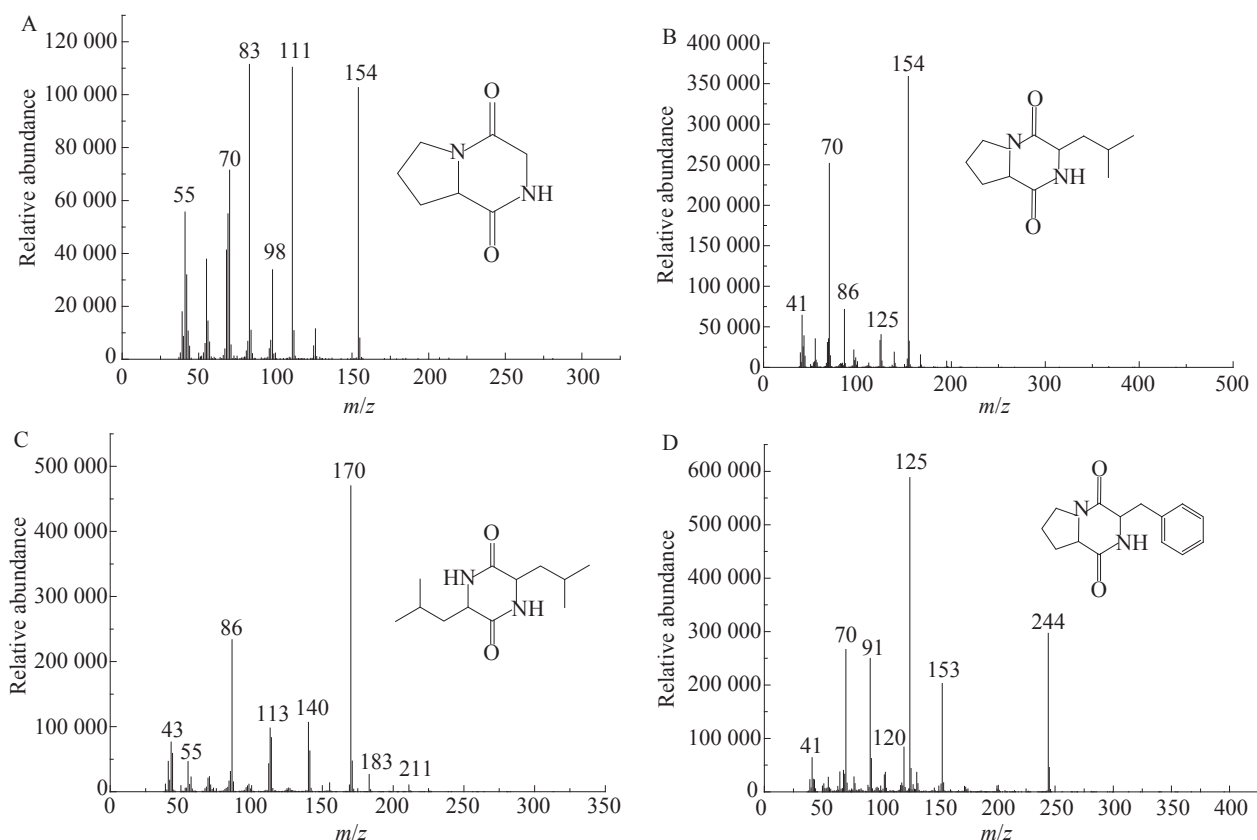


图2 4 种 DKPs 标准品 EI 质谱图

Figure 2 The EI mass spectrum of four kinds of DKPs standards by GC-MS

注: A: Cyclo-(L-Pro-L-Gly)质谱图; B: Cyclo-(L-Pro-L-Leu)质谱图; C: Cyclo-(L-Leu-L-Leu)质谱图; D: Cyclo-(L-Pro-L-Phe)质谱图。

Note: The EI mass spectrum of cyclo-(L-Pro-L-Gly); B: The EI mass spectrum of cyclo-(L-Pro-L-Leu); C: The EI mass spectrum of cyclo-(L-Leu-L-Leu); D: The EI mass spectrum of cyclo-(L-Pro-L-Phe).

表 1 4 种 DKPs 标准品 SIM 参数
Table 1 The SIM parameter of four kinds of DKPs standards

DKPs	特征离子 Characteristic ion	保留时间 Retention time (min)	扫描时间 Scanning time (min)
Cyclo-(L-Pro-L-Gly)	83, 111, 154, 70	13.443	12.576–13.609
Cyclo-(L-Pro-L-Leu)	154, 70, 86, 41	14.566	14.498–14.701
Cyclo-(L-Leu-L-Leu)	170, 86, 140, 113	15.071	14.968–15.141
Cyclo-(L-Pro-L-Phe)	125, 70, 91, 152	17.641	17.512–18.046

表 2 4 种 DKPs 的保留时间、线性方程、相关系数、检测限和定量限
Table 2 Retention time, linear range, correlation coefficients, limit of detection and limit of quantification of four kinds of DKPs

DKPs	保留时间 Retention time (min)	线性方程 Linear range	相关系数 Correlation coefficients	检测限 LOD (mg/L)	定量限 LOQ (mg/L)
Cyclo-(L-Pro-L-Gly)	13.443	$Y=0.000\ 20x+2.645\ 0$	0.999 7	0.06	0.16
Cyclo-(L-Pro-L-Leu)	14.566	$Y=0.000\ 05x+2.645\ 5$	0.999 5	0.10	0.18
Cyclo-(L-Leu-L-Leu)	15.071	$Y=0.000\ 10x-119.660\ 0$	0.998 8	0.06	0.14
Cyclo-(L-Pro-L-Phe)	17.641	$Y=0.000\ 08x-78.287\ 0$	0.999 1	0.04	0.12

2.3 回归方程

4 种标准品利用 GC-MS-SIM 进行分析后得到的回归方程如表 2 所示。经 GC-MS-SIM 分析得出各回归方程的相关系数 R^2 均大于 0.998, 相关性好。并且 GC-MS 经 SIM 定量后得到更低的检测限和定量限, 其中检测限为 0.04–0.10 mg/L, 定量限为 0.12–0.18 mg/L。

2.4 准确度和精密度

采用 GC-MS-SIM 分析 4 种 DKPs 信号分子 2.5、50 和 150 mg/L 混合标准溶液的精密密度、准确度和回收率, 如表 3、4 和 5 所示。得到日内精密密度 3.2%–9.1%, 准确度 96.4%–107.8%, 日间精密密度为 2.2%–10.2%, 准确度为 97.1%–105.6%。加标量为 2.5、50、150 mg/L 时, 平均回收率分别为 51.8%–71.2%、66.2%–88.5%和 64.1%–84.9%, 标准偏差分别为 2.7%–5.4%、1.4%–7.2% 和 1.7%–8.3%。该方法能满足实际检测要求。

2.5 培养基对 DKPs 产生的影响

如表 6 所示, *P. fluorescens* 在 LB 和 TSB 培养基中都形成两种 DKPs 信号分子

Cyclo-(L-Pro-L-Leu)和 Cyclo-(L-Pro-L-Phe), 其中 LB 中含量为 4.43 mg/L 和 3.91 mg/L, TSB 中含量为 3.95 mg/L 和 2.73 mg/L。*S. baltica* 在两种培养基中也检测出相同的信号分子, LB 中含量为 5.43 mg/L 和 4.18 mg/L, TSB 中含量为 4.8 mg/L 和 1.12 mg/L。同时以未接种培养基为空白对照, 检测结果未达到检测限, 数据则未显示。结果表明, *P. fluorescens* 和 *S. baltica* 在 LB 培养基中分泌的 DKPs 含量显著高于 TSB 培养基($P<0.05$), 其中 Cyclo-(L-Pro-L-Phe)对培养基的变化更敏感。Ortori 等^[14]也报道铜绿假单胞菌在 LB 培养基中分泌的 AHL 信号分子浓度显著高于自制培养基(CDM)。

2.6 萃取溶剂对 DKPs 提取的影响

进一步比较提取溶剂(氯仿和乙酸乙酯)对 DKPs 活性的影响, 如表 7 所示。氯仿和乙酸乙酯萃取溶剂显著影响细菌培养液中 DKPs 含量($P<0.05$)。氯仿作为萃取溶剂时, *P. fluorescens* 和 *S. baltica* 总 DKPs 含量分别为 8.34 mg/L 和 9.61 mg/L, 而乙酸乙酯萃取时, 两种细菌中总 DKPs 含量分别为 7.01 mg/L 和 9.12 mg/L, 分别减少 16.8%和 5.8%。

表3 方法的日内精密度和准确度
Table 3 Intra-day precision and accuracy of assay method determined in spiked bacterial extract

DKPs	精密度 Precision (RSD%)			准确度 Accuracy (%)		
	L	M	H	L	M	H
Cyclo-(L-Pro-L-Gly)	3.2	5.8	7.9	97.1	99.4	98.6
Cyclo-(L-Pro-L-Leu)	7.3	5.4	4.8	106.4	96.4	102.3
Cyclo-(L-Leu-L-Leu)	5.6	8.2	4.3	104.6	97.7	98.3
Cyclo-(L-Pro-L-Phe)	8.3	6.5	9.1	96.2	102.6	107.8

Note: L: 2.5 mg/L; M: 50 mg/L; H: 150 mg/L.

表4 方法的日间精密度和准确度
Table 4 Inter-day precision and accuracy of assay method determined in spiked bacterial extract

DKPs	精密度 Precision (RSD%)			准确度 Accuracy (%)		
	L	M	H	L	M	H
Cyclo-(L-Pro-L-Gly)	6.5	7.6	5.6	102.7	98.6	99.2
Cyclo-(L-Pro-L-Leu)	2.2	3.1	5.5	104.2	97.9	103.8
Cyclo-(L-Leu-L-Leu)	4.8	6.7	9.6	98.4	99.1	100.4
Cyclo-(L-Pro-L-Phe)	4.2	10.2	3.6	97.1	101.3	105.6

表5 方法的回收率
Table 5 Recovery rate of assay method determined in spiked bacterial extract

DKPs	回收率 Recovery rate (SD%)		
	L	M	H
Cyclo-(L-Pro-L-Gly)	65.7±5.4	67.4±7.2	77.2±8.3
Cyclo-(L-Pro-L-Leu)	71.2±2.7	66.2±1.4	84.9±1.7
Cyclo-(L-Leu-L-Leu)	68.3±4.2	88.5±1.8	74.3±5.2
Cyclo-(L-Pro-L-Phe)	51.8±3.5	71.3±6.5	64.1±4.9

表6 LB和TSB培养基对*P. fluorescens*和*S. baltica*中DKPs活性的影响
Table 6 Effects of LB and TSB medium on content of DKPs from *P. fluorescens* and *S. baltica*

DKPs	LB (mg/L)		TSB (mg/L)	
	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. baltica</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. baltica</i>
Cyclo-(L-Pro-L-Leu)	4.43±0.19 ^b	5.43±0.23 ^a	3.95±0.21 ^b	4.81±0.26 ^b
Cyclo-(L-Pro-L-Phe)	3.91±0.17 ^b	4.18±0.25 ^a	2.73±0.15 ^c	1.12±0.08 ^d

注: 表格中同行不同字母表示差异显著($P<0.05$).

Note: Different letters within the same line mean significant difference ($P<0.05$).

可见, 氯仿作为细菌培养上清萃取溶剂获得的DKPs活性更高。

2.7 GC-MS分析*P. fluorescens*和*S. baltica*的DKPs

使用的*P. fluorescens* LP1和*S. baltica* XH2分别从冷藏大菱鲆和大黄鱼中分离鉴定的特定腐败菌, 具有生长速度快, 腐败活性高的特点^[15]。如图3所示, 利用上述优化的条件进行定量分析, 两种细菌均产生两种相同的DKPs信号分子, 出峰时间Cyclo-(L-Pro-L-Leu)为14.574 min, Cyclo-(L-Pro-L-Phe)为17.663 min。*P. fluorescens*形成的两种DKPs含量分别是4.43 mg/L和3.91 mg/L, *S. baltica*产生的两种DKPs含量分别是5.43 mg/L和4.18 mg/L, 其中Cyclo-(L-Pro-L-Leu)含量更高。进一步分析了培养时间对两种DKPs形成的影响, *P. fluorescens*和*S. baltica*在LB培养基中生长迅速, 15 h达到稳定期。随着细菌的生长, 培养基上清液中的DKPs逐步增加, 在细菌对数后期12 h时DKPs的含量最高, 分别达到8.34 mg/L和9.61 mg/L, 之后逐步下降, 其中18 h下降约20%, 18 h后下降量较少。Gu等^[3]发现*S. baltica*能够产生4种DKPs [Cyclo-(L-Pro-L-Gly)、Cyclo-(L-Pro-L-Leu)、Cyclo-(L-Leu-L-Leu)和Cyclo-(L-Pro-L-Phe)]参与腐败作用。綦国红等^[16]发现鱼源*P. fluorescens*群体感应信号分子(N-3-oxo-C₈-HSL)与腐败存在内在关联。然而, DKPs在腐败菌群体感应系统中的调控机制及在菌体内的代谢途径仍未明晰, 有待于进一步的探究。

表 7 氯仿和乙酸乙酯萃取对 *P. fluorescens* 和 *S. baltica* 中 DKPs 活性的影响
Table 7 Effects of chloroform and ethyl acetate extraction on content of DKPs from *P. fluorescens* and *S. baltica*

DKPs	氯仿 Chloroform (mg/L)		乙酸乙酯 Ethyl acetate (mg/L)	
	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. baltica</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. baltica</i>
Cyclo-(L-Pro-L-Leu)	4.43±0.19 ^b	5.43±0.23 ^a	3.37±0.23 ^c	5.45±0.16 ^a
Cyclo-(L-Pro-L-Phe)	3.91±0.17 ^b	4.18±0.25 ^a	3.64±0.15 ^b	3.67±0.21 ^b

注：表格中同行不同字母表示差异显著($P<0.05$).
Note: Different letters within the same line mean significant difference ($P<0.05$).

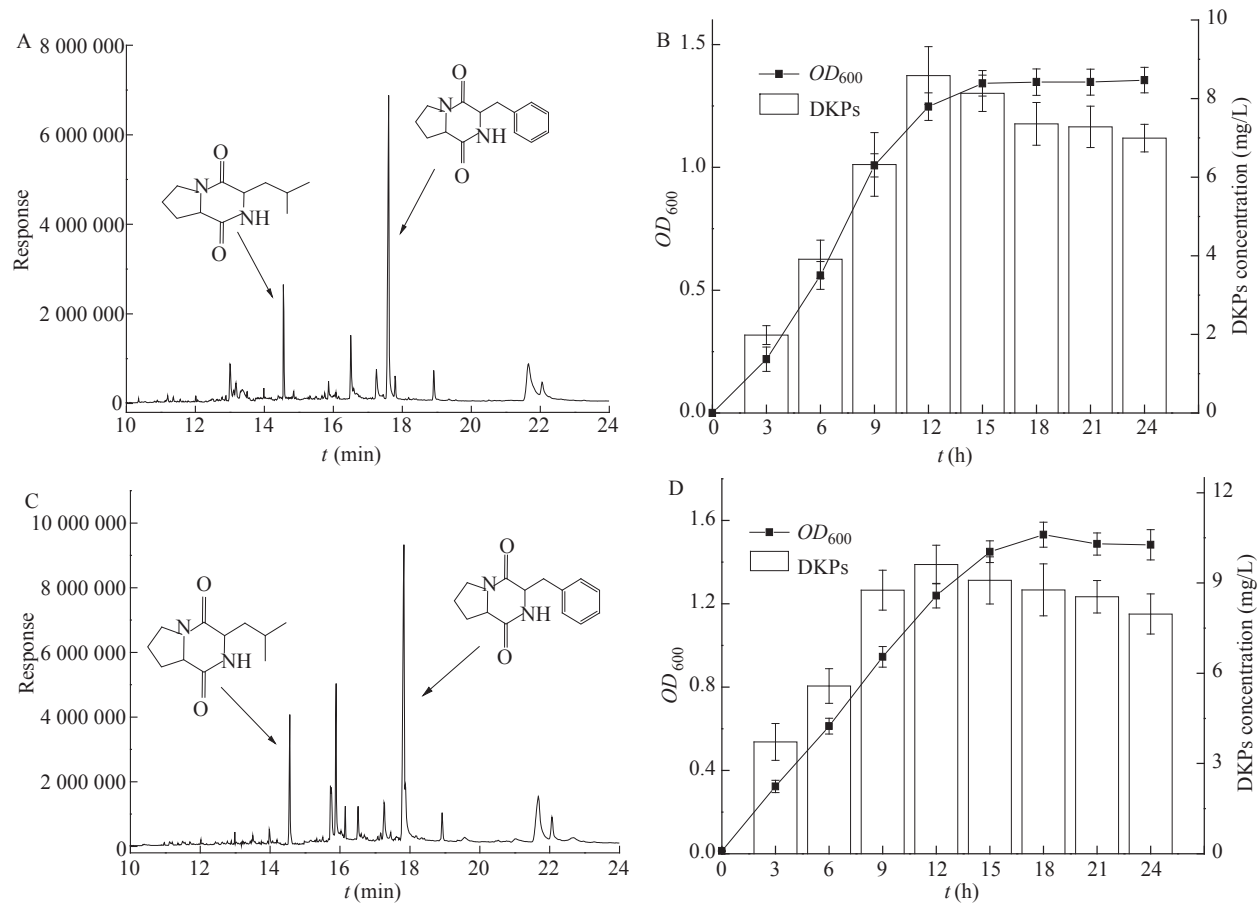


图 3 *P. fluorescens* 和 *S. baltica* 生长曲线及 DKPs 含量的变化

Figure 3 Changes in growth curve and DKPs content of *P. fluorescens* and *S. baltica*

注：A: *P. fluorescens* 产生的 DKPs GC-MS 色谱图；B: *P. fluorescens* 生长曲线及 DKPs 含量；C: *S. baltica* 产生的 DKPs GC-MS 色谱图；D: *S. baltica* 生长曲线及 DKPs 含量。

Note: A: Chromatogram of DKPs produced from *P. fluorescens*; B: Growth curve and DKPs content of *P. fluorescens*; C: Chromatogram of DKPs produced from *S. baltica*; D: Growth curve and DKPs content of *S. baltica*.

3 结论

本研究建立的 GC-MS-SIM 定量检测 DKPs 方法, 具有精密度、灵敏度、准确度高的优点。同时发现采用 LB 培养基及提取溶剂氯仿检测细菌中的 DKPs 灵敏度更高。该方法应用于 *P. fluorescens* 和 *S. baltica* 两种腐败菌信号分子分析, 发现都产生 Cyclo-(L-Pro-L-Leu) 和 Cyclo-(L-Pro-L-Phe) 两种 DKPs, 含量在细菌对数生长末期最高。因此, 本方法能够适用于定量检测细菌的 DKPs 信号分子, 为其功能研究奠定了技术支持。

参考文献

- [1] Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2005, 21(1): 319-346
- [2] Nealson KH, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance[J]. Microbiological Reviews, 1979, 43(4): 496-518
- [3] Gu QQ, Fu LL, Wang YB, et al. Identification and characterization of extracellular cyclic dipeptides as quorum-sensing signal molecules from *Shewanella baltica*, the specific spoilage organism of *Pseudosciaena crocea* during 4 °C storage[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(47): 11645-11652
- [4] Degraess G, Aguilar C, Bosco M, et al. Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors[J]. Current Microbiology, 2002, 45(4): 250-254
- [5] Holden MTG, Ram CS, de Nys R, et al. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria[J]. Molecular Microbiology, 1999, 33(6): 1254-1266
- [6] Steindler L, Venturi V. Detection of quorum-sensing *N*-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 266(1): 1-9
- [7] Yang YH, Lee TH, Kim JH, et al. High-throughput detection method of quorum-sensing molecules by colorimetry and its applications[J]. Analytical Biochemistry, 2006, 356(2): 297-299
- [8] Shaw PD, Ping G, Daly SL, et al. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(12): 6036-6041
- [9] Fekete A, Frommberger M, Rothballer M, et al. Identification of bacterial *N*-acylhomoserine lactones (AHLs) with a combination of ultra-performance liquid chromatography (UPLC), ultra-high-resolution mass spectrometry, and *in-situ* biosensors[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 387(2): 455-467
- [10] Cataldi TRI, Bianco G, Palazzo L, et al. Occurrence of *N*-acyl-L-homoserine lactones in extracts of some Gram-negative bacteria evaluated by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Analytical Biochemistry, 2007, 361(2): 226-235
- [11] Huang XZ, Zhu ZL, Zhao EK, et al. Detection of *N*-acylated-L-homoserine lactones of quorum sensing secreted by pathogen and spoilage bacteria from aquatic product using liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(7): 1040-1046 (in Chinese)
黄旭镇, 朱军莉, 赵二科, 等. LC-MS/MS 检测水产品源致病细菌和腐败菌群体感应 AHLs 信号分子[J]. 水产学报, 2014, 38(7): 1040-1046
- [12] Axel C, Zannini E, Arendt EK, et al. Quantification of cyclic dipeptides from cultures of *Lactobacillus brevis* R2Δ by HRGC/MS using stable isotope dilution assay[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(9/10): 2433-2444
- [13] Brack C, Mikolasch A, Schauer F. 2,5-Diketopiperazines produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus*[J]. Marine Biotechnology, 2014, 16(4): 385-395
- [14] Ortori CA, Dubern JF, Chhabra SR, et al. Simultaneous quantitative profiling of *N*-acyl-L-homoserine lactone and 2-alkyl-4(1*H*)-quinolone families of quorum-sensing signaling molecules using LC-MS/MS[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 399(2): 839-850
- [15] Zhao EK, Zhu JL, Feng LF, et al. Preliminary mechanism of different spoilage potential of specific spoilage organism, *Shewanella*, in refrigerated *Larimichthys crocea*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(2): 256-264 (in Chinese)
赵二科, 朱军莉, 冯立芳, 等. 冷藏大黄鱼 SSO 希瓦氏菌致腐能力差异机制初探[J]. 水产学报, 2015, 39(2): 256-264
- [16] Qi GH, Dong MS, Chen XH, et al. Research on relationship between quorum sensing signal molecules and characteristics of spoilage in *Pseudomonas* spp. isolated from fish[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(7): 1486-1491 (in Chinese)
綦国红, 董明盛, 陈晓红, 等. 鱼源假单胞菌群体感应信号分子与腐败特性相关关系的研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(7): 1486-1491